

回接内生真菌对工业大麻生理及农艺性状的影响<sup>\*</sup>金蕊<sup>1</sup>, 杨明挚<sup>1\*\*</sup>, 刘飞虎<sup>1,2\*\*</sup>

(1 云南大学生命科学学院; 2 云南大学农学院, 云南 昆明 650091)

**摘要:** 回接工业大麻中分离出的 6 种内生真菌于大田种植的云麻 1 号, 研究了内生真菌对工业大麻酶活性及农艺性状的影响。结果表明: 接种毛壳菌和镰孢菌的大麻植株 SOD 和 POD 活性显著提高 ( $P < 0.05$ ); 除炭疽菌外, 小不整球壳菌、毛壳菌、黑孢霉、镰孢菌和粘束孢均提高了大麻植株的麻皮干重和麻皮厚度; 毛壳菌处理组大麻植株的节间长、麻皮干重、麻皮厚度均显著高于对照 ( $P < 0.05$ )。这些结果为大麻生产中合理利用内生真菌制剂促进大麻优质丰产及深入研究内生真菌的作用机制奠定基础。

**关键词:** 内生真; 工业大麻; 大田种植; 酶活性; 农艺性状

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2014)01-065-05

Effects of Endophytic Fungi Re-inoculation on Physiological and Agronomic Characters of Hemp (*Cannabis sativa*)JIN Rui<sup>1</sup>, YANG Ming-Zhi<sup>1\*\*</sup>, LIU Fei-Hu<sup>1,2\*\*</sup>

(1 College of Life Science; 2 College of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** We report a study of the effects of inoculating hemp (*Cannabis sativa*) with six different species of endophytic fungi. Both physiological and agronomic effects of inoculation were examined. The results indicate that inoculation with *Chaetomium* sp. and *Fusarium* sp. increases significantly the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), while dry weight and thickness of hemp fiber are increased when inoculated with *Plectosphaerella* sp., *Chaetomium* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp. and *Graphium* sp. Inoculation with *Chaetomium* sp. also increases significantly the length of internodes. These results provide a preliminary foundation for appropriate use of endophytic fungi to improve hemp quality, and why further study of such effects would be of value.

**Key words:** Endophytic fungi; Industry hemp; Field planting; Enzyme activity; Agronomic characters

植物内生真菌是指那些在其生活史的一定或全部阶段生活于植物健康组织和器官内部, 而不使宿主表现出明显感染症状的真菌 (Hyde 和 Soyong, 2008)。据估计, 自然界中真菌大约有 150 万种, 而其中大部分以内生真菌的方式存在 (Arnold 等, 2002)。内生真菌的数量巨大且分布广泛, 地球上现存的所有植物都是一种或多种内生真菌的宿主 (Hyde 和 Soyong, 2008)。研究发现, 植物内生真菌可以改善植物的营养条件, 促

进植物生长, 还可以通过产生次生代谢物及快速激活宿主的逆境反应系统增强宿主对环境的生态适应能力 (陈世莘等, 2001; 文才艺等, 2004; 谢丽华等, 2006); 有些内生真菌还被发现能够产生与宿主相同或相似的活性物质 (Aly 等, 2010)。已证实一些内生真菌是部分新型天然产物的潜在来源, 而这些天然产物在医学、农业和工业方面具有重要价值 (Rodriguez 等, 2009; Lin 等, 2010)。许多内生真菌已作为生物防治

\* 基金项目: 国家麻类产业技术体系工业大麻栽培岗位科学家 (CARS-19) 经费资助

\*\* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: mzh-yang@163.com; hnplantbreed@gmail.com

收稿日期: 2013-01-10, 2013-03-04 接受发表

作者简介: 金蕊 (1987-) 女, 在读硕士生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: jinrui10673@sina.cn

剂、固氮菌剂和植物促生制剂,广泛应用于实验室、温室和大田(张烨等,2010)。

大麻(*Cannabis sativa* L.)为大麻科大麻属一年生草本植物,其栽培历史悠久,是一种古老的韧皮纤维作物(郭媛等,2011)。大麻含致幻剂四氢大麻酚(THC),工业大麻是大麻的品种类型,其THC含量<0.3%,无毒品吸食的价值,但纤维具有极高的经济价值,可以进行工业化种植与利用。目前,工业大麻栽培中存在产量较低、适应性弱、纤维品质较差等问题,加之受到耕地面积和栽培环境的限制,严重制约了工业大麻的种植及其产业发展。目前,未见关于工业大麻内生真菌的报道,但通过植物内生真菌改善工业大麻的适应性、纤维品质以及提高麻纤维产量是一条值得尝试的新途径。本研究选用从工业大麻(云麻1号)中分离出的6种内生真菌,研究了这6种内生真菌对大麻生理活性及农艺性状的影响,为大麻生产中合理利用内生真菌促进大麻优质丰产和深入研究内生真菌的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试大麻为云南省农业科学院选育的工业大麻品种:云麻1号。内生真菌菌种:6种内生真菌,小不整球壳菌(*Plectosphaerella* sp.)、毛壳菌(*Chaetomium* sp.)、黑孢霉(*Nigrospora* sp.)、炭疽菌(*Colletotrichum* sp.)、镰孢菌(*Fusarium* sp.)、粘束孢菌(*Graphium* sp.)分离于云麻1号叶部,该植株样品采自云南西双版纳州勐海县,处于工艺成熟期,平均高度约1.8 m,生长期中,未使用任何杀菌剂。种植区海拔约1 500 m,年平均气温18.7℃,年均降水量1 341 mm。菌株现保存于本实验室。

菌剂制备:从PDA培养基上生长5 d的菌落边缘挑取0.5 cm×0.5 cm的菌落3块于灭菌的500 mL PD培养液中,28℃、120 r/min摇床培养5 d,用无菌纱布过滤菌丝后,将菌丝在灭菌的研钵中捣碎再与菌液充分混合,各菌剂最终定容至900 mL。菌剂制备完毕后,立即喷施。按喷施次数共制备4批。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 本实验采用随机区组设计,即区组内设7个处理,处理1:小不整球壳菌处理组;处理2:毛壳菌处理组;处理3:黑孢霉处理组;处理4:炭疽菌处理组;处理5:镰孢菌处理组;处理6:粘束孢处理组;

处理7:对照CK。区组设3次重复,每个区组内7个处理皆随机排列。每个处理为一个小区,小区间设置保护行,每个小区畦长1 m,畦宽1.7 m,面积1.7 m<sup>2</sup>,共21个小区,小区和保护区的播种密度均为30株/m<sup>2</sup>,每个小区播种三行,正常田间管理。实验地位于云南昆明大麻种植基地,该地气候温和,光照充足,年平均气温15℃,年均降水量1 035 mm。播种前实验地均匀施肥。

1.2.2 内生真菌菌剂回接方法 当大麻株高达到40 cm左右时,选择晴朗的傍晚,采用喷施接种法用等体积的菌剂均匀喷施对应小区大麻植株,每个小区喷施300 mL,对照用等体积的无菌水代替。每隔7 d喷施一次,共喷施4次。若喷施后12 h内下雨,则重新喷施。

1.2.3 植物收获及指标测定 第4次喷施处理后一星期,从每个小区随机选取3株大麻植株,取生长顶端向下第4对叶分别测定抗氧化酶系POD(张以顺等,2009)、SOD(李合生,2000)活性和纤维素酶活性(GB/T23881-2009),每个处理各项指标重复测定3次。

在工艺成熟期测定大麻的7项农艺指标。收获各小区大麻植株的所有地上部分,测其株高并称鲜重;去枝叶后,随机选取10株,测茎粗、节间长、茎节数;从各小区随机选取10株大麻植株取其1/2处茎秆剥皮,用游标卡尺测麻皮厚;将每个小区所有大麻茎秆用打麻机剥皮,晾干后称其干皮重。

1.2.4 实验数据统计与作图 实验数据应用SPSS 18.0统计软件进行方差分析、采用EXCEL 2007作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌对大麻酶活性的影响

POD和SOD是植物抗逆性的重要指标,二者协同作用防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害(陈佳昕等,2008)。测定结果发现,毛壳菌及镰孢菌两个处理组,大麻的POD、SOD活性显著高于对照CK且毛壳菌处理组>镰孢菌处理组。其他菌剂处理组与对照组均未达到显著性差异( $P>0.05$ )(图1,2)。镰孢菌处理组纤维素酶活性显著低于对照CK( $P<0.05$ )(图3)。

### 2.2 内生真菌对大麻农艺性状的影响

收获期,测定大麻的7项农艺指标。结果表明,喷施的6种真菌菌剂,对大麻的鲜重、株高、茎粗和茎节数等指标无显著影响。毛壳菌处理组,大麻节间长与对照达到显著性差异;除炭疽菌处理组,其他处理组大麻植株的麻皮干重均大于对照,且除镰孢菌外均与对照达到显著差异,

其中毛壳菌效果最显著 ( $P < 0.05$ )；除炭疽菌外，其他处理组的麻皮厚均大于对照，但并未与对照达到显著差异。炭疽菌处理组的麻皮厚显著低于毛壳菌处理组、镰孢菌处理组及粘束孢处理组，但与对照没有差异（表 1）。

### 3 结论与讨论

研究发现，回接毛壳菌和镰孢菌显著提高了大麻抗逆性酶 POD 和 SOD 的活性，说明内生真菌增强了大麻的防御能力，提高了对外界胁迫的耐受能力；其他 4 种菌剂处理组 SOD 和 POD 与对照相似，引起抗逆性酶的变化较小。另外，镰

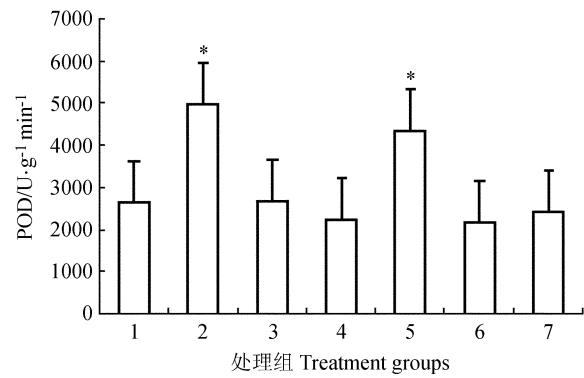


图 1 内生真菌对云麻 1 号过氧化物酶活性的影响

Fig. 1 Effects of endophytic fungi on the POD activity of Yunnan hemp 1

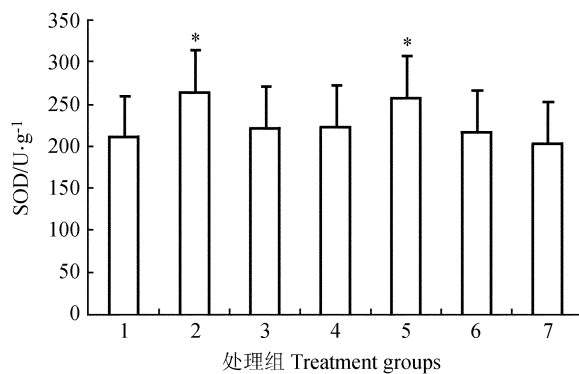


图 2 内生真菌对云麻 1 号超氧化物酶活性的影响

Fig. 2 Effects of endophytic fungi on the SOD activity of Yunnan hemp 1

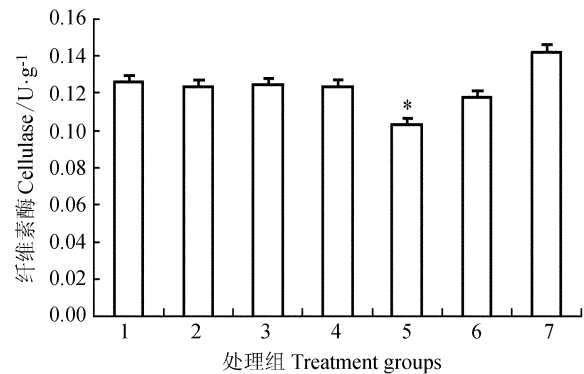


图 3 内生真菌对云麻 1 号纤维素酶活性的影响

Fig. 3 Effects of endophytic fungi on the cellulase activity of Yunnan hemp 1

表 1 不同处理大麻的农艺指标

Table 1 Agronomic traits of different treated hemp

| 农艺指标<br>Agronomic index                             | 处理组 Treatment groups             |                            |                            |                               |                          |                          |              |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
|                                                     | <i>Plectosphaerella</i><br>sp. 1 | <i>Chaetomium</i><br>sp. 2 | <i>Nigrospora</i><br>sp. 3 | <i>Colletorichum</i><br>sp. 4 | <i>Fusarium</i><br>sp. 5 | <i>Graphium</i><br>sp. 6 | CK<br>7      |
| 鲜重 Fresh weight<br>(kg/sample area)                 | 8.53±0.30a                       | 8.33±0.23a                 | 8.63±0.38a                 | 8.90±0.20a                    | 8.07±0.64a               | 8.63±0.21a               | 8.30±0.44a   |
| 株高 Height/cm                                        | 337.33±7.76a                     | 338.33±5.51a               | 330.00±8.54a               | 334.00±1.73a                  | 333.67±12.05a            | 330.00±5.00a             | 330.67±7.02a |
| 茎粗 Stem<br>diameter/cm                              | 1.52±0.01a                       | 1.33±0.11a                 | 1.57±0.15a                 | 1.47±0.13a                    | 1.53±0.18a               | 1.43±0.06a               | 1.43±0.13a   |
| 茎节数 Number<br>of stem nodes                         | 11.33±0.58a                      | 11.67±0.58a                | 12.00±1.00a                | 11.33±0.58a                   | 11.33±0.58a              | 12.00±0.00a              | 12.33±1.53a  |
| 节间长 Distance<br>of inter-node/cm                    | 22.33±1.16ab                     | 23.67±1.16a                | 22.33±2.52ab               | 21.00±1.73ab                  | 22.67±1.53ab             | 21.00±2.00ab             | 20.33±1.16b  |
| 麻皮干重 Dry weight<br>of hemp bark<br>(kg/sample area) | 0.29±0.09a                       | 0.30±0.06a                 | 0.29±0.12a                 | 0.27±0.10c                    | 0.29±0.05ab              | 0.29±0.08a               | 0.27±0.06bc  |
| 麻皮厚 Thickness<br>of hemp bark/mm                    | 0.38±0.02ab                      | 0.41±0.02a                 | 0.38±0.02ab                | 0.36±0.01b                    | 0.41±0.05a               | 0.41±0.02a               | 0.37±0.02ab  |

注：表中数值为平均数±标准差，同行不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Notes: The values in table is averages ± standard deviation, different letters indicating the significant difference ( $P < 0.05$ )

孢菌处理组大麻的纤维素酶活性显著低于对照,有利于大麻纤维的形成;其他菌剂处理组大麻的纤维素酶活性虽然低于对照,但与对照没有显著差异。除炭疽菌外,毛壳菌、镰孢菌、小不整球壳菌、黑孢霉和粘束孢均提高了大麻的麻皮干重和麻皮厚,但所有菌剂处理组的麻皮厚与对照没有显著差异。这表明接种内生真菌能促进大麻植株中干物质的积累,这可能是真菌刺激了植物防御性的代谢活动,促进细胞壁的增厚。内生真菌能够诱导植物次生代谢物的合成和积累,这是植物-微生物相互作用的普遍特征(陈晓亚,2006)。这些内生真菌可能产生或刺激了大麻中植物激素的合成,如生长素类、赤霉素类。生长素类 IAA 可以促进韧皮部的分化,促进蔗糖向韧皮部的装载;赤霉素能促进整个植株的伸长生长。提高大麻麻皮干重和厚度具有重要的实际意义,真菌在未影响大麻植株正常生长的前提下,提高了这些麻皮干重和厚度,相当于提高了大麻纤维产量。

炭疽菌处理组的某些农艺指标低于对照,这表明炭疽菌的“入侵”在一定程度上影响了大麻的正常生长。不同菌剂处理间存在的差异可能与菌种特性存在密切联系,具体原因有待进一步研究。炭疽菌曾被报道是热带植物常见的优势属(Devaraju 和 Satish, 2010),感染炭疽菌属内生真菌后宿主植物具有很强的抗病、抗旱性(Rodríguez 等, 2008)。然而,回接炭疽菌对大麻的生理活性及农艺性状并未表现出促进作用。这可能有以下几种原因:(1)炭疽菌回接的成功率低,喷施并未使其成功侵入大麻植株体内;(2)内生真菌在植物体的整个微生态中所起的作用不同,菌群的数量与其在群落中的地位不成正相关,反而数量上不占优势的菌属成为一个微生物群落中的关键种影响宿主的生活状态;(3)大麻本身携带的内生真菌占据各自的生态位已达到了一种平衡,炭疽菌在微生态群落中的数量已经达到饱和状态,大麻会排斥炭疽菌的入侵或使其替代其中的任何一种菌群。

本研究所发现的一些内生真菌的“侵入”对大麻植株表现出显著的促生作用,这表明,对大麻接种内生真菌,促进生长和提高抗逆性的方法是可以尝试的。然而种植环境的变化以及土壤

微生物生态环境中的许多因素都会影响到内生真菌的作用发挥(国辉等, 2011)。因此,深入了解内生真菌与大麻的作用机制,是今后大量推广真菌菌剂,提高大麻产量的基础。

本研究未对大麻纤维品质的相关指标进行测定,只是一次初步的筛选试验,后期针对有影响的内生菌再次进行回接试验,将充分检测大麻纤维的其它品质指标。另外,POD、SOD 等酶活性具有一定的时空性,未来的研究中应考察接种内生真菌后各种酶活性在植株不同生长时期及不同部位的变化趋势。

### 〔参 考 文 献〕

- 李合生, 2000. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社
- 张以顺, 黄霞, 陈云凤, 2009. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 高等教育出版社
- Aly AH, Debbab A, Kjer J *et al.*, 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products [J]. *Fungal Diversity*, **41** (1): 1—16
- Arnold A, Maccheroni Z, Gilbert GS *et al.*, 2002. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? [J]. *Ecology Letters*, **3** (4): 267—274
- Chen SP (陈世苹), Gao YB (高玉葆), Liang Y (梁宇) *et al.*, 2001. Effects of endophyte infection on protective enzyme activities in leaves of *Lolium perenne* under water stress [J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology* (应用与环境生物学报), **7** (4): 348—354
- Chen JX (陈佳昕), Dai CC (戴传超), Li X (李霞) *et al.*, 2008. Endophytic fungi screening from *Atractylis lancea* and inoculating into the host plantlet [J]. *Guihaia* (广西植物), **28** (2): 256—260
- Chen XY (陈晓亚), 2006. Plant secondary metabolism [J]. *World Sci-Tech R & D* (世界科技研究与发展), **28** (5): 1—4
- Devaraju R, Satish S, 2010. Endophytic fungi: ‘Trapped’ or ‘hidden’ store houses of bioactive compounds within plants: a review [J]. *Journal of Pharmacy Research*, **3** (12): 2986—2989
- Guo Y (郭媛), Wang YF (王玉富), Qiu CS (邱财生) *et al.*, 2011. Preliminary study on effects of drought stress on physiological characteristics and growth of different hemp Cultivars (*Cannabis Sativa*) [J]. *Plant Fiber Science in China* (中国麻业科学), **33** (5): 235—239
- Guo H (国辉), Mao ZL (毛志泉), Liu XL (刘训理), 2011. Research progress of interaction between plant and microorganism [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **27** (9): 28—33

- Hyde K, Soyong K, 2008. The fungal endophyte dilemma [J]. *Fungal Diversity*, **33**: 163—173
- Lin X, Huang YJ, Zheng ZH *et al.*, 2010. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene [J]. *Fungal Diversity*, **41** (1): 41—51
- Rodriguez RJ, White JJ, Arnole AE *et al.*, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles [J]. *New Phytologist*, **182** (2): 314—330
- Rodriguez RJ, Henson J, Volkenburgh WE *et al.*, 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis [J]. *The ISME Journal*, **2** (4): 404—416
- Wen CY (文才艺), Wu YH (吴元华), Tian XL (田秀玲), 2004. Recent advances and issues on the endophyte [J]. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), **23** (2): 86—91
- Xie LH (谢丽华), Wang GH (王国红), Yang MH (杨民和), 2006. Endophytic fungi and their effects on the ecological adaptability of host plants [J]. *Journal of Fungal Research* (菌物研究), **4** (3): 98—106
- Zhang Y (张烨), Liao Y (廖怡), Cheng SY (陈尚武) *et al.*, 2010. Isolation, preliminary identification and nitrogen-fixation activity of endophytes from roots of one- and two-year-old *Xanthoxerces sorbifolia* plants [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), **34** (7): 839—844

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

[上接第 40 页]

(2) 对单个或少数几个种做了核型分析, 但对系统学或分类学没有多少实际意义的稿件不再接受发表; 单种属的核型研究论文, 内容充实者和确有新意者可接受投稿。

## 2.2 对植物生态学与资源管理稿件的要求

(1) 植物生态学稿件: 要求在系统综述国内外前期研究工作的基础上, 明确提出科学假设(说), 制定与此相对应的研究方案, 通过野外调查(监测)、实验室控制实验等方法采集数据, 在统计学分析结果的支持下, 验证作者提出的科学假设, 以解决关键科学问题, 为植物生态学的理论发展做出新贡献。没有具体科学目标的、描述性的植物群落学调查资料原则上不再接受发表。

(2) 植物资源管理稿件: 研究对象主要控制在物种、生态系统和景观水平。稿件分为两类: 第一类是应用生态学的基本原理, 研究或构建具有良好经济效益和生态效益的植物资源管理体系, 并分析其生态系统的功能和维持机制; 第二类是新开发的植物资源报道或系统整理(包括物种/亚种/变种/品种、群落等), 应该明确说明资源的现状(分布或储量)、用途、开发利用前景等。第二类稿件一般作为研究简报发表, 篇幅不超过 4 个印刷页。

## 2.3 对于植物生理与分子生物学稿件的要求

要求稿件的内容对认识植物具有重要的或新的生物学事件、过程的意义、功能有贡献, 不再接受仅仅描述配方改进、实验过程调整或测量数据堆砌的论文。

## 2.4 对植物化学稿件的要求

(1) 原则上论文请用英文撰写; (2) 论文中要有新化合物; (3) 或已知化合物新的生物活性; (4) 若无新化合物, 但前人对其化学成分缺乏研究, 可以用简报的形式发表, 但篇幅不超过一个页码, 主要说明其中各种成分即可, 不必罗列大量分析数据和化学结构。

## 3 特别说明

3.1 鼓励通过本刊在线投稿系统 (<http://journal.kib.ac.cn>) 投稿, 也可通过 email 发电子文件进行投稿, 如通过电子邮件投稿两周后未收到编辑部任何反馈信息, 请来函或电话查询。

3.2 综述性论文主要以主编、学科副主编或编委约稿的形式获得, 并经审稿同意后发表。

3.3 本刊在审稿程序中设有绿色通道, 学科副主编将在收到稿件时根据自己对稿件内容涉及的学科领域、稿件质量的判断, 提出稿件进入 1) 正常审稿程序、2) 退稿或 3) 进入绿色通道(即直接向主编推荐接受, 优先刊登)的建议。稿件至少由两位外审专家审阅以决定是否接受发表, 稿件的录用与否一般在收到来稿 2 个月内及时给予通知。

3.4 为使作者的稿件顺利通过审稿和及时发表, 请作者在撰写稿件时严格按我刊格式准备, 写作时做到思路清晰、逻辑严密、句子通顺、衔接过渡、前后呼应、凸显创新、详简适度。对写作粗糙的稿件(如格式不符、英文摘要不地道、输入文字错误较多、句子不通、写作思路不清晰、标点符号使用不规范或中英文标点混用等), 编辑部将直接退稿。

3.5 具体写作要求请登陆本刊网站查询。

地址: 云南省昆明市盘龙区蓝黑路 132 号 邮政编码: 650201; 电话/传真: (0871) 65223032

单位: 中国科学院昆明植物研究所 《植物分类与资源学报》编辑部

E-mail: [bianji@mail.kib.ac.cn](mailto:bianji@mail.kib.ac.cn); [linnana@mail.kib.ac.cn](mailto:linnana@mail.kib.ac.cn); 网址: <http://journal.kib.ac.cn>